

Effect of Chloroform Fraction of Tribulus Terrestris (TT) Fruit on Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle Arrest of AGS Cancer Cell Line

Marzie Kavoussi Ghahfarokhi¹,
Homa Mohseni Kochesfehiani²,
Mahmoud Rafieian-Kopaei³,
Pezhman Beshkar⁴,
Hedayatollah Shirzad⁵

¹ MSc in Animal Cell and Developmental Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³ Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁴ MSc in Hematology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁵ Professor, Cell and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received April 15, 2014 ; Accepted November January 17, 2015)

Abstract

Background and purpose: Adenocarcinoma gastric cancer is one of the most common cancers of upper gastrointestinal tract. Many natural compounds are known to have anti-tumor activities through induction of tumor cell apoptosis. *Tribulus terrestris* is a plant with antioxidant and anti-inflammatory effects that has been recommended in the world and Iranian traditional medicine. These effects have been proven in some recent studies. This study was performed to evaluate the anti-tumoral effect of chloroform fraction fruit of *Tribulus terrestris* (TT) on human adenocarcinoma gastric cancer.

Materials and methods: In this experimental study, AGS cells were first cultured in standard conditions in plate and then incubated with different concentrations of chloroform fraction for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined using MTT assay. Cell death induction and cell cycle arrest were determined using flow cytometry.

Results: The results demonstrated that the chloroform fraction decreased AGS cell viability in a concentration and time-dependent manner. The data indicate that this fraction increased apoptosis effectively in AGS cell line and cell cycle was arrested at G0/G1 phase.

Conclusion: The effective compounds of the chloroform fraction of the plant *Tribulus terrestris* (TT) fruit induced apoptotic cell death in human gastric cancer cells. These compounds could be of great benefit in prevention or treatment of human gastric cancer.

Keywords: Adenocarcinoma gastric cancer, apoptosis, *Tribulus terrestris*, cell cycle

بررسی اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر تکثیر، چرخه سلولی و القای آپوپتوز در سلول های AGS آدنوکارسینومای معده

مرضیه کاوسی قهفرخی^۱

هما محسنی کوچصفهانی^۲

محمود رفیعیان کوپایی^۳

پژمان بشکار^۴

هدایت الله شیرزاد^۵

چکیده

سابقه و هدف: سرطان های معده جزء رایج ترین بدخیمی های دستگاه گوارش فوقانی می باشند. بسیاری از ترکیبات طبیعی خواص ضدسرطان خود را از طریق القای آپوپتوز در سلول های سرطانی اعمال می کنند. گیاه خارخاسک با نام علمی *Tribulus terrestris* گیاهی است که در طب سنتی ایران و جهان توصیه شده و اثرات آنتی اکسیدانی، ضدتوموری و ضد التهابی آن در مطالعات اخیر به اثبات رسیده است. با توجه به اثرات القای آپوپتوز و مهارکنندگی تومور توسط ترکیبات مختلف میوه گیاه *Tribulus terrestris*، لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر تکثیر، چرخه سلول و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی انسانی آدنوکارسینومای معده AGS می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا سلول های AGS در محیط کشت استاندارد درون پلیت های ۹۶ خانه کشت داده شده و در ادامه با غلظت های مختلف از فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. درصد بقا سلول ها به روش MTT، نوع مرگ سلولی القا شده و توقف چرخه سلولی به روش فلوسایتمتری بررسی شدند. **یافته ها:** نتایج نشان داد که فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک تکثیر سلول های سرطانی AGS را در یک الگوی وابسته به غلظت و زمان کاهش داد. هم چنین این فرکشن به طور موثری آپوپتوز را القا و چرخه سلولی را در مرحله G0/G1 متوقف نمود.

استنتاج: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، فرکشن کلروفرمی TT مرگ سلولی آپوپتوز را القا و چرخه سلولی را در سلول های AGS متوقف نمود. بنابراین این ترکیب می تواند در آینده به عنوان یک عامل موثر در پیشگیری و درمان سرطان آدنوکارسینومای معده مطرح شود.

واژه های کلیدی: سرطان معده، آپوپتوز، خارخاسک، چرخه سلولی

مقدمه

تومورهای بدخیم اپیتلیالی فراوان ترین نوع سرطان هستند که سرطان معده یکی از این نوع سرطان ها است. این سرطان از نظر بروز، چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان منجر به مرگ در جهان است (۱).

E-mail: Shirzadeh@yahoo.com

مؤلف مسئول: هدایت الله شیرزاد - شهرکرد: رحمتیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۱. کارشناس ارشد سلولی - تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴. کارشناس ارشد همتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۵/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۲۷

در بین انواع سرطان‌های معده، آدنوکارسینوماها ۹۵ درصد تومورهای بدخیم معده را شامل می‌شوند و ۵ درصد بقیه را لنفوما، تومورهای استرومال و سایر تومورهای نادر تشکیل می‌دهند (۲). در طی ۵۰ سال گذشته بروز آدنوکارسینومای معده در کشورهای صنعتی غربی کاهش یافته، این در حالی است که این روند در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش است. طبق بررسی صورت گرفته در ایران میزان مرگ و میر ناشی از سرطان معده ۳۹ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان است و سالانه از هر ۱۰۰۰۰ نفر، ۲۵ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند (۳). پراکندگی ابتلا به این بیماری در کشور یکنواخت نیست و استان‌های شمالی و شمال غربی بیش‌ترین آمار ابتلا را دارند. هم‌چنین روند رو به افزایش این بیماری در استان‌های غربی نگران‌کننده است.

عوامل ژنتیکی، فردی، محیطی و عفونی در ایجاد سرطان معده دخیل هستند (۴، ۵). هم‌چنین به طور معمول مردان ۲ برابر بیش‌تر از زنان به این بیماری مبتلا می‌شوند (۶).

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای درمان سرطان‌ها صورت گرفته است. از جمله این روش‌ها جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی را می‌توان نام برد. ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می‌باشد (۷). بنابراین تحقیق در جهت تولید داروهایی با سمیت کم‌تر و کارایی موثرتر ضروری است (۸، ۹). در این میان ترکیبات طبیعی و به ویژه گیاهان دارویی یک نقش بسیار مهم در درمان بسیاری از انواع بیماری‌ها از جمله سرطان دارند. بسیاری از این گیاهان حاوی عواملی بر ضد سرطان هستند که می‌توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند (۱۰، ۱۱).

گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) یک گیاه یک ساله خرنده است که در چین، کره، ژاپن، غرب آسیا، ایران و جنوب آفریقا می‌روید. در طب سنتی این گیاه برای درمان انواع بیماری‌ها شامل فشارخون بالا،

بیماری‌های قلب و عروق، درمان ناباروری در هر دو جنس و درمان بیماری‌های قارچی استفاده می‌شود. هم‌چنین اثرات ضدالتهابی، دیورتیک، تاثیر در درمان بیماری‌های کبدی، دیابت و هیپرپلازی پروستات نیز برای این گیاه گزارش شده است (۱۲). تجزیه‌ی شیمیایی عصاره‌ی میوه‌ی این گیاه مشخص کرده که ترکیبات شیمیایی اصلی آن شامل ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، استرول و تروسترو سین‌های E تا A می‌باشد و آثار فارماکولوژیک میوه‌ی این گیاه را به این ترکیبات نسبت می‌دهند (۱۲، ۱۳). وجود ساپونین‌ها و هم‌چنین ترکیبات فنولی در عصاره‌ی این گیاه به آن خاصیت ضدسرطان و آنتی اکسیدانی می‌دهد. ساپونین‌ها به دلیل تنوع ساختاری زیاد، از مسیرهای مختلف اثر ضد توموری ایجاد می‌کنند (۱۴، ۱۵).

موفقیت ترکیبات موثر بر سلول‌های سرطانی تا حد زیادی به توانایی این ترکیبات در فعال‌سازی مسیرهایی بستگی دارد که مرگ سلولی را با واسطه توقف سیکل سلولی و القای آپوپتوز سبب می‌شوند (۱۶).

آپوپتوز فرایند بسیار مهمی در جلوگیری از پیشرفت تومور می‌باشد و نقش بسیار مهمی در درمان انواع تومورها ایفا می‌کند. به بیان دیگر امروزه یکی از بهترین استراتژی‌های به کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است. آپوپتوز یکی از اشکال مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌باشد که جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آن به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶). حفظ هوموستازی و همین‌طور عملکرد تکوینی در بافت‌های طبیعی ناشی از تعادل بین مرگ سلولی از طریق آپوپتوز و تکثیر می‌باشد. آپوپتوز بدون این که منجر به ایجاد واکنش‌های خود ایمنی و یا پاسخ‌های التهابی گردد، موجب هدف‌گیری سلول به سمت مرگ می‌گردد. ایجاد اختلال در مسیر وقوع آپوپتوز منجر به بروز مشکلاتی هم‌چون ایجاد تومور، نامیرایی سلول و متاستاز می‌گردد (۱۷).

به منظور کشف داروهای گیاهی ضدسرطان جدید و به دنبال تحقیقات صورت گرفته توسط Raja و همکاران بر روی عصاره‌های مختلف استخراجی توسط حلال‌های مختلف از میوه گیاه خارخاسک، که نشان داد عصاره‌ی کلروفرمی دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی اثبات شده بیش‌تری نسبت به آب و اتانول است (۱۸)، در این تحقیق سعی شد تا تاثیر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطان آدنوکارسینومای معده بررسی شود. هم‌چنین به منظور بررسی کارایی این ترکیب، توقف سیکل سلولی و نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوز یا نکروز) در سلول‌های سرطانی معده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری و جداسازی فرکشن:

در این تحقیق، گونه گیاهی خارخاسک (*Tribulus terrestris*) موجود در منطقه فرخ‌شهر استان چهارمحال و بختیاری در ابتدای فصل پاییز پس از جمع‌آوری توسط هرباریوم دانشگاه خوارزمی واحد پردیس کرج و مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری مورد شناسایی قرار گرفت. به منظور تهیه‌ی عصاره‌ی تام، ابتدا میوه خشک گیاه را به صورت پودر درآورده و مقدار ۵۰۰ گرم از آن در متانول ۸۰ درصد به روش خیساندن maceration به مدت ۳ تا ۴ روز قرار دادیم. پس از هر ۲۴ ساعت محلول رویی را از صافی گذرانده و حلال جدید به پودر افزودیم. سپس عصاره را توسط دستگاه روتاری تغلیظ و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا حلال آن کاملاً خارج گردید.

جداسازی فرکشن:

به منظور جداسازی فرکشن کلروفرمی ابتدا از حلال هگزان به منظور جداسازی ترکیبات چرب گیاه استفاده شد. ۵۰ گرم از پودر عصاره با ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان شستشو داده و ۳ تا ۴ روز، هر ۲۴ ساعت محلول

رویی را از صافی گذرانده و حلال جدید اضافه گردید. این کار تا جایی ادامه یافت که محلول کاملاً بی‌رنگ گردید. محلول را خارج و پودر باقی مانده را کاملاً خشک نمودیم. در این مرحله به پودر ۵۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و ۳ تا ۴ روز، هر ۲۴ ساعت محلول رویی را از صافی گذرانده و حلال جدید افزودیم. این کار را تا جایی ادامه یافت که محلول کاملاً بی‌رنگ شد. محلول حاصل را توسط روتاری تغلیظ و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار دادیم تا حلال آن کاملاً خشک گردید (۱۹).

آماده‌سازی فرکشن برای MTT

به منظور آماده‌سازی فرکشن برای تست MTT، پودر فرکشن را در DMSO (Sigma) حل نموده و از فیلتر عبور داده سپس غلظت‌های نهایی مورد نظر را از حل کردن این استوک در محیط کشت ۱۰ درصد تهیه نمودیم.

کشت سلول

رده‌ی سلولی آدنوکارسینومای معده انسانی (AGS) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران را در محیط کشت DMEM (Sigma, USA) غنی شده با FBS ۱۰ درصد (Gibco, USA)، آنتی بیوتیک ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (Gibco) کشت داده شد و در درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید. برای انجام تست‌های مختلف سلول‌ها توسط محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد EDTA ۰/۱ درصد (Gibco) جدا شده و پس از شستشو، درصد زنده بودن سلولی با استفاده از تریپان بلو توسط هموسیستم سنجیده شد.

سنجش میزان رشد و تکثیر سلولی

برای بررسی تاثیر فرکشن کلروفرمی گیاه خارخاسک بر میزان رشد و تکثیر سلولی از روش رنگ سنجی که به اختصار MTT-2, 5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3-diphenyl tetrazolium bromide نامیده می‌شود،

استفاده شد. این روش بر پایه‌ی توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فورامازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است. به منظور انجام این تست تعداد 5×10^3 سلول AGS در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از فرکشن گیاهی ($300-350-400-450$ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. برای انجام این تست از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد و در هر یک از زمان‌های تیمار به هر غلظت حداقل سه چاهک اختصاص داده شد. سه چاهک نیز به عنوان کنترل بدون دارو (کنترل منفی) و سه چاهک حاوی DMSO ۰/۱ درصد به عنوان گروه Sham مورد بررسی قرار گرفت.

پس از طی زمان مورد نظر به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر) (Sigma) اضافه و سلول‌ها به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان، دی متیل سولفو کساید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رشد سلولی توسط فرمول زیر محاسبه گردید (۱۹):

درصد بقا: میانگین جذب نوری نمونه تیمار / میانگین جذب نوری نمونه کنترلی $\times 100$

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس:

پس از کشت سلول‌های AGS و تیمار نمودن آن‌ها با غلظت‌های مورد نظر از فرکشن گیاهی خارخاسک و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی به دقت با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی آپوپتوز و نکروز سلولی:

آنکسین V، پروتئینی است که در یک رفتار وابسته به کلسیم به فسفاتیدیل سرین (PS) موجود در غشاء پلاسمایی متصل می‌شود. سلول‌هایی که در مراحل اولیه‌ی

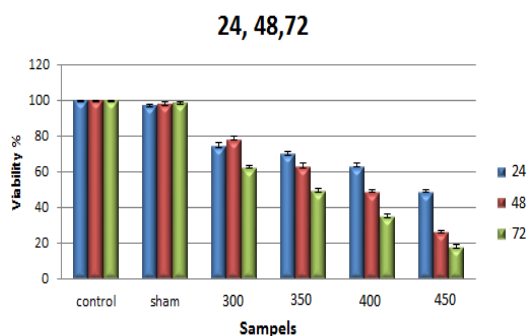
آپوپتوز می‌باشند، PS را از نیمه درونی غشاء پلاسمایی به نیمه خارجی آن می‌فرستند. سلول‌هایی که در مرحله آغازی آپوپتوز هستند، از لحاظ برهم کنش با آنکسین FITC-V، که FITC متصل به آن فلورسانس سبز ایجاد می‌کند، مثبت می‌باشند. به منظور مهیا کردن سلول‌ها جهت بررسی مرگ آپوپتوتیک ناشی از تیمار با فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک در غلظت IC_{50} (غلظتی از ماده که ایجاد ۵۰ درصد سمیت یا مرگ و میر در سلول می‌نماید)، با روش فلوسایتومتری مراحل زیر انجام شد:

(۱) تعداد 2×10^5 سلول سرطانی AGS در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت داده شد؛ (۲) پس از اتمام زمان انکوباسیون سلولی (در غیاب و در حضور غلظت‌های ذکر شده از فرکشن کلروفرمی خارخاسک) محلول روی سلول‌ها برداشته شد؛ (۳) سلول‌ها را توسط PBS (Sigma) شستشو داده؛ (۴) به منظور جداسازی سلول‌ها از کف چاهک به هر چاهک محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد- EDTA ۰/۱ درصد اضافه و حدود ۳ دقیقه انکوبه و پس از جدایی سلول‌ها از کف چاهک به منظور خنثی سازی تریپسین ۱ میلی لیتر محیط کشت ۱۰ درصد اضافه و محلول حاصل به محیطی که قبلاً برداشته شد، اضافه گردید؛ (۵) محلول حاصل با دور ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محیط رویی دور ریخته شد؛ (۶) جهت انجام شستشو به سلول‌ها PBS اضافه، مجدداً سانتریفیوژ نمودیم؛ (۷) سلول‌ها را به حالت سوسپانسیون در آورده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بایندینگ بافر ۱ درصد موجود در کیت (BD) را به آن‌ها اضافه و مجدداً سانتریفیوژ نمودیم؛ (۸) مرحله ۷ را تکرار کرده؛ (۹) تعدادی از سلول‌ها را داخل لوله فلوسایتومتری برده و به هر لوله ۲ میکرولیتر آنتی‌بادی آنکسین V- و ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی PI اضافه کردیم (BD, USA)؛ (۱۰) نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تاریکی انکوبه و در پایان این زمان با دستگاه فلوسایتومتری (Partec Germany) آنالیز نمودیم (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آزمون ANOVA one-way و با استفاده از نرم افزار InStat-3 انجام شد. حداقل سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر میزان بقا سلولی رده سلولی AGS با روش MTT نشان داد که این ترکیب در یک الگوی وابسته به زمان و غلظت منجر به القا مرگ سلولی در این رده گردید. درصد بقا سلول‌های تحت تیمار با فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک در غلظت‌های ۳۰۰ تا ۴۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار شماره ۱ آمده است.



نمودار شماره ۱: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر سلول‌های سرطانی AGS در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بر اساس سنجش MTT. ($p < 0.05$). (Mean \pm S.D)

بنابر نتایج به دست آمده، غلظتی از این ترکیب که منجر به القا ۵۰ درصد مرگ سلولی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گردید به ترتیب ۴۵۰، ۴۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. درصد بقا سلول‌ها در غلظت‌های ۳۰۰ تا ۴۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محیط کشت در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل، به ترتیب ۷۵، ۷۱، ۶۵ و ۴۹ درصد، در زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه

فلوسایتومتری با اندازه‌گیری محتوای DNA سلولی وسیله‌ی مناسبی جهت بررسی چرخه سلولی می‌باشد. PI یک کاوشگر غیراختصاصی DNA است که در DNA تشکیل یک کمپلکس فلورسنت می‌دهد. PI به وسیله‌ی تابش نور برانگیخته می‌شود و فلورسنس قرمز ساطع می‌کند. شدت فلورسنس ساطع شده نشان دهنده‌ی محتوای DNA در آن نقطه از چرخه‌ی سلول می‌باشد.

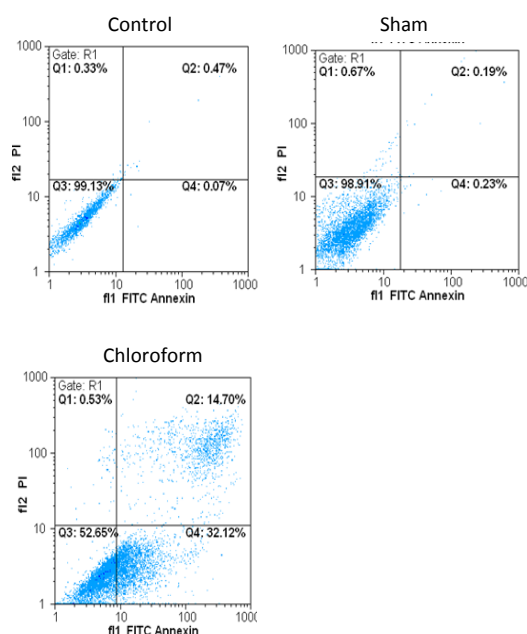
به منظور بررسی روند ادامه‌ی چرخه‌ی سلولی پس از تیمار توسط فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک مراحل زیر انجام شد:

۱) تعداد 2×10^5 سلول سرطانی AGS در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت داده شد؛ ۲) پس از اتمام زمان انکوباسیون سلولی (در غیاب و در حضور غلظت‌های ذکر شده از فرکشن کلروفرمی خارخاسک) محلول روی سلول‌ها برداشته شد؛ ۳) سلول‌ها طبق روش ذکر شده در مرحله قبل از کف پلیت جدا و به صورت سوسپانسیون در آمد؛ ۴) محلول حاصل را با دور ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده، محیط رویی را دور ریخته؛ ۵) جهت انجام شستشو به سلول‌ها PBS اضافه مجدداً سانتریفیوژ نمودیم و محیط رویی را دور ریختیم؛ ۶) سلول‌ها را به صورت سوسپانسیون در آورده و به آن‌ها اتانول ۷۰ درصد اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت روی یخ قرار دادیم؛ ۷) پس از طی زمان مذکور، محلول حاصل با دور ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۸) مجدداً سوسپانسیون سلولی توسط PBS شستشو و سانتریفیوژ گردید؛ ۹) در این مرحله به منظور لیز کردن RNA موجود در محیط به سلول‌ها RnaseA (Sigma) اضافه کرده و هم زمان رنگ PI (Sigma) را نیز افزودیم. محلول را به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه و در پایان این زمان با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز نمودیم (۲۱).

به منظور بررسی الگوی مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) در سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با غلظت IC_{50} از فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک، از روش رنگ آمیزی سلولی با آنکسین V کونزوگه با فلئوئورسین ایزوتیوسیانات (آنکسین FITC-V) و پروپدیوم آیوداین (PI) استفاده شد. طبق نتایج حاصل از تکنیک فلوسایتمتری، درصد القای آپوپتوز اولیه در سلول‌های کنترل، کنترل منفی و تیمار شده با فرکشن کلروفرمی به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۴۷ و ۳۲/۱۲ درصد، آپوپتوز ثانویه ۰/۶۲، ۰/۴۳ و ۱۴/۷ درصد و میزان نکروز القایی ۰/۶۱، ۰/۸ و ۰/۵۳ درصد می‌باشد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۲).

جدول شماره ۱: مقایسه اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر القای نوع مرگ سلولی بر سلول‌های AGS پس از ۴۸ ساعت از تیمار. بر طبق جدول این فرکشن مرگ سلولی را بیش تر به صورت آپوپتوز القا کرد ($p < 0.05$, Mean \pm S.D).

Cells	LR درصد	UR درصد
Control	۹۹/۱۳	۰/۳۳
Sham	۹۸/۹۱	۰/۶۷
Chloroform fraction	۵۲/۶۵	۳۲/۱۲

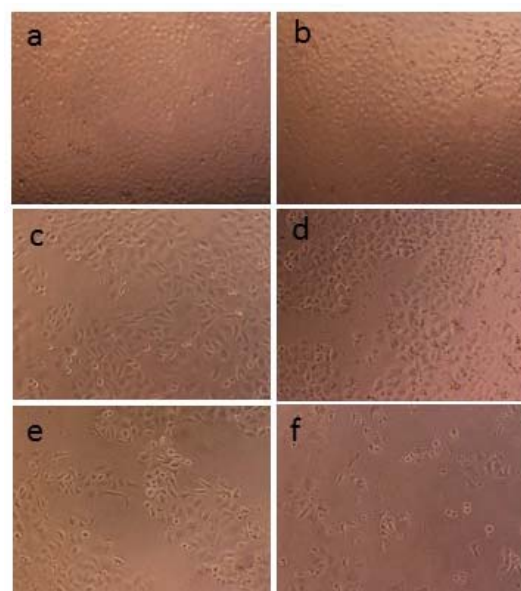


تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از آزمون فلوسایتمتری. اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر روی سلول‌های سرطانی AGS

کنترل به ترتیب ۷۸، ۶۳، ۴۹ و ۲۶ درصد و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار نسبت به کنترل به ترتیب ۶۳، ۴۹، ۳۵ و ۱۸ درصد بود ($p < 0.05$, Mean \pm S.D).

آنالیز مورفولوژیک سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک

به منظور بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با فرکشن مذکور به مدت ۴۸ ساعت به دقت توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد که سلول‌ها قبل از تیمار به صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملاً طبیعی دیده می‌شدند. در صورتی که پس از تیمار با این ترکیب بسته به میزان دوز دریافتی درجات مختلفی از تغییر شکل مشاهده گردید. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود، با افزایش دوز فرکشن کلروفرمی، سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها حالت طبیعی خود را از دست داده‌اند و تعداد سلول‌ها به صورت چشمگیری کاهش یافته است.



تصویر شماره ۱: فتومیکروگراف از تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های AGS نسبت به گروه کنترل که تحت تاثیر غلظت‌های مختلف فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک در مدت زمان ۴۸ ساعت قرار گرفته‌اند. بزرگ نمایی $400\times$. گروه a: کنترل، گروه b: Sham، گروه c: تیمار با دوز ۳۰۰، گروه d: تیمار با دوز ۳۵۰، گروه e: تیمار با دوز ۴۰۰، گروه f: تیمار با دوز ۴۵۰.

پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار. نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهند که دوز IC_{50} این فرکشن موجب القای مرگ سلولی آپوپتوزی در رده سلولی AGS گردید. در منحنی، جمعیت سلول‌های زنده در سمت چپ پایین (LL)، سلول‌های در مراحل اولیه آپوپتوز در سمت راست پایین (LR) و سلول‌های در مراحل انتهایی آپوپتوز در سمت راست بالا (UR) قرار دارند.

بحث

به طور کلی، درمان‌های گیاهی به طور متداول برای درمان بیماری‌های مختلف مانند ناراحتی‌های قلبی عروقی، اعصاب و روان، التهاب، درد و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲-۲۴). این درحالی است که اطلاعات کافی در مورد مکانیسم عمل آن‌ها وجود ندارد (۲۵). امروزه ترکیبات گیاهی بسیار با اثرات بیولوژیکی متنوع وجود دارد که بخشی از داروهای ضدسرطانی را در علم داروسازی نوین تشکیل می‌دهند (۲۶، ۲۷). با توجه به این که سرطان بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر در زنان و مردان است، تحقیق و تولید داروهای ضدسرطانی با کارایی بیش‌تر و عوارض کم‌تر امری ضروری می‌باشد (۹۸).

در این تحقیق تاثیر سمیت فرکشن کلروفرمی جدا شده از میوه گیاه خارخاسک، رشد کرده در ایران بر سلول‌های سرطانی معده AGS توسط تست MTT بررسی شد. یافته‌های حاصل نشان داد که این ترکیب سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی به صورت الگوی وابسته به غلظت و زمان می‌شود به طوری که این ترکیب در ۲۴ ساعت در غلظت ۴۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۴۸ ساعت در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۷۲ ساعت در غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب القای ۵۰ درصد مرگ سلولی در این رده می‌شود. بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس یک ویژگی اصلی سلول آپوپتوزی یعنی تراکم هسته و ایجاد واکوئل‌های آپوپتوزی را نشان می‌دهد. هم‌چنین طبق آنالیز فلوسایتومتری مرگ سلولی القایی از نوع آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز G_0/G_1 رخ می‌دهد.

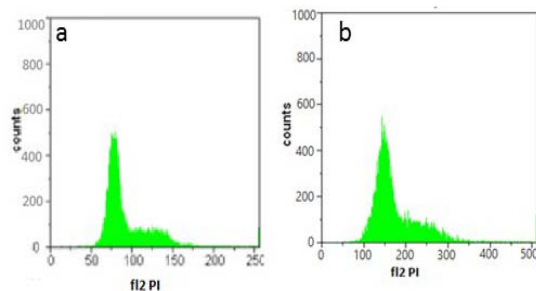
در توافق با نتایج حاصل تحقیقات Neychev و همکاران نشان داد که ساپونین‌های جدا شده از عصاره‌ی بخش‌های هوایی گیاه خارخاسک با تغییر

ارزیابی تغییر چرخه سلولی به روش فلوسایتومتری:

به منظور بررسی چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی معده قبل و بعد از تیمار با فرکشن کلروفرمی خارخاسک به مدت ۴۸ ساعت، از روش رنگ‌آمیزی با رنگ PI استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که توقف سلول‌های تیمار شده با ترکیب گیاهی در فاز G_0/G_1 به میزان معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (جدول شماره ۲). این امر نشان می‌دهد که فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک حاوی موادی است که عبور سلول از مرحله G_0 به مرحله G_1 را مختل می‌نماید (تصویر شماره ۳).

جدول شماره ۲: مقایسه اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر توقف سیکل سلولی در ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. طبق جدول این ترکیب سیکل سلولی را در مرحله G_0/G_1 متوقف ساخته است ($p < 0.05$, Mean \pm S.D).

G2/M	S	G0/G1	Cells
درصد	درصد	درصد	
۲۲/۸	۵۴/۲	۱۸/۴	Control
۲۲/۴	۵۴	۱۸/۷	Sham
۵/۵	۲۰/۵	۵۷/۱	Chloroform



تصویر شماره ۳: نتایج حاصل از آزمون فلوسایتومتری. اثر فرکشن کلروفرمی میوه گیاه خارخاسک بر روی سلول‌های سرطانی AGS پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار. نتایج حاصل از این آزمون نشان

سطح پلی آمین‌ها در سلول سبب تغییر رشد، تکثیر و بقا سلول‌ها می‌گردد که این اثر در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های فیبروبلاستی پوست بسیار چشمگیر می‌باشد و به نظر می‌رسد در شروع آپوپتوز نقش دارد (۲۸). Angelova و همکاران در طی مطالعه‌ای بر خواص ضدتوموری عصاره تام و ساپونین‌های استخراج شده از برگ گیاه خارخاسک دریافتند که این دو ترکیب قادر به القای مهار رشد و آپوپتوز در رده سلولی MCF7 به میزان بیش‌تری نسبت به سلول‌های طبیعی سینه بوده و فرکشن ساپونینی اثر قوی‌تری نسبت به عصاره تام القا نمود (۲۹).

Bedir و همکاران گزارش کردند که ساپونین‌های استروئیدی مشتق از گیاه خارخاسک سبب سرکوب تکثیر در لاین‌های ملانومای بدخیم انسانی SK-MEL، کارسینومای اپیدرم دهانی KB، سرطان سینه BT-549 و سرطان تخمدان SK-OV-3 می‌گردد (۳۰).

با توجه به مطالب ذکر شده مشاهده می‌گردد که در اکثر مطالعات انجام گرفته و مطابق با آن چه در تحقیق حاضر به دست آمد، عصاره‌های به دست آمده از بخش‌های مختلف گیاه خارخاسک و هم‌چنین ترکیبات خالص‌سازی شده از آن‌ها دارای خواص ضدتکثیری می‌باشند. هم‌چنین این ترکیبات سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده آپوپتوز می‌گردند. البته نتایج حاصل در گستره‌ی نسبتاً وسیعی متفاوت می‌باشند که این تفاوت ممکن است به علت تفاوت ترکیبات شیمیایی و هم‌چنین تفاوت ساختار ترکیبات فعال در گیاه در مناطق مختلف جغرافیایی باشد. از طرفی میزان حساسیت سلول‌های مختلف سلولی متفاوت است. به طوری که در تحقیقی که Hu و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی اثر سمیت متیل پروتوگراسیلین (NSC-688792) بر ۶۰ سل

لاین متفاوت انجام دادند، مشاهده کردند که میزان حساسیت سلول‌های مختلف به این ماده متفاوت است (۳۱). در گزارشی دیگر Kim و همکاران بیان کردند که عصاره‌ی آبی میوه گیاه خارخاسک تکثیر سلولی را بلوکه کرده و آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی کبد HPG2 از طریق سیگنالینگ NFκB و به صورت وابسته به دوز مهار می‌کند. آن‌ها نشان دادند که این عصاره با مهار پروتئین P50 و افزایش سطح IκBα منجر به مهار فعالیت NFκB می‌گردد. در حالی که این اثر بر روی سلول‌های نرمال کبدی دیده نشد. هم‌چنین این ترکیب سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 گردید (۲۰)، که همسو با نتایج به دست آمده در تاثیر فرکشن کلروفرمی بر روی سلول‌های AGS می‌باشد. با توجه به وجود ترکیبات غیرقطبی در فرکشن کلروفرمی نسبت به ترکیبات قطبی موجود در عصاره آبی، به نظر می‌رسد که ترکیبات غیر قطبی در مدت زمان کوتاه‌تر و غلظت پایین‌تری اثرات ضدتکثیری را القا و آپوپتوز اولیه را به میزان بیش‌تری اعمال نمودند. بنابراین تحقیقات بیش‌تر به منظور جداسازی ترکیبات موثر موجود در این فرکشن و بررسی دقیق مکانیسم مولکولی تاثیر آپوپتوتیک آن و اثر آن بر رده‌های سلولی دیگر و حیوانات مدل و پس از آن کارآزمایی بالینی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گرفته است. از مدیریت محترم گروه ایمونولوژی و ریاست محترم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی که امکانات اجرایی این طرح را فراهم نمودند سپاسگزارم.

References

1. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of

Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location.

-
- Gastroenterology 2009; 137(3): 824-833.
2. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RCJ, Gansler TS, Holland JF, Frei EL. Tumor markers and immunodiagnosis. 6th ed. Cancer Medicine Canada, Hamilton: BC Decker Inc; 2003.
 3. Yazdanbod A, Arshi SH, Derakhshan M, Sadjadi A, Malekzadeh R. Gastric Cardia Cancer; The Most Common Type of Upper Gastrointestinal Cancer in Ardabil, Iran: An Endoscopy Clinic Experience. Arch Iran Med 2001; 4(2): 76-79.
 4. Hartgrink HH, Jansen EP, Grieken NC, Velde CJ. Gastric cancer. Lancet 2009; 374(9688): 477-490.
 5. Rahimi F, Heidari M. Time Trend Analysis of Stomach Cancer Incidence in the West of Iran. J Health Dev 2012; 1(2): 100-111.
 6. Irvani Sh, Sadeghi SH. Evaluation of epidemiologic characteristics of patients with gastric cancers in Shohada-e-tajrish Medical Center between the 1378-1384. JAUMS 2006; 4(2): 825-827.
 7. Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, Malfertheiner P. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background. Helicobacter 2011; 16(Suppl1): 45-52.
 8. Dardaei Alghalandi S, Shahsavani R, Ghavamzadeh A, Behmanesh M, Aslankoochi E, Alimoghadam K, et al. Development of a quantitative Real-Time PCR for micrometastasis detection using CEA in peripheral blood and bone marrow specimens of gastric cancer patients. Tehran Univ Med J 2009; 67(8): 542-548.
 9. Shakeri R, Malekzadeh R, Etemadi A, Nasrollahzadeh D, Aghcheli K, Sotoudeh M. Opium: An emerging risk factor for gastric adenocarcinoma. Int J Cancer 2013; 133: 455-462.
 10. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. Bioorg Med Chem 2005; 13 (21): 5892-5908.
 11. Narayanaswamy N, Balakrishnan K. Evaluation of some medicinal plants for their antioxidant properties. Int J PharmTech Res 2011; 3(1): 381-385.
 12. Yang HJ, Qu WJ, Sun B. Experimental study of saponins from Tribulus terrestris on renal carcinoma cell line. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2005; 30(16): 1271-1274
 13. Ivanova A, Serly J, Dinchev D, Ocsovszki I, Kostova I, Molnar J. Screening of some saponins and phenolic components of Tribulus terrestris and Smilax excelsa as MDR modulators. In Vivo 2009; 23(4): 545-550.
 14. Valiyari S, Baradaran B, Delazar A, Pasdaran A, Zare F. Dichloromethane and methanol extracts of scrophularia oxysepala induces apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Adv Pharm Bull 2012; 2(2): 223-231.
 15. Feng Z, Cao Y, Gao Y, Li Q, Li G. Effect of gross saponin in Tribulus Terrestris on ruminal fermentation and methane production invitro. J Anim Vet Adv 2012; 11(12): 2121-2125.
 16. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. Nature Reviews Cancer 2005; 5: 876-885.
 17. Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. Cell Cycle J 2007; 6(6): 686-695.
 18. Raja M, Venkataraman R. Pharmacognostical studies on Tribulus terrestris and Tribulus alatus. Der Pharmacia Sinica 2011; 2(4): 136-139.
-

19. Hajimehdipoor H, Esmaeili S, Ramezani A, Jafari M, Mosaddegh M. The Cytotoxic Effects of *Ferula Persica* var. *Persica* and *Ferula Hezarlalehzarica* against HepG2, A549, HT29, MCF7 and MDBK Cell Lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 8(2): 113-117.
20. Kim HJ, Kim JC, Min JS, Kim MJ, Kim JA, Kor MH, et al. Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF- κ B signaling in liver cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 136(1): 197-203.
21. Noonan EJ, Place RF, Basak Sh, Pookot D, Li LC. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget* 2010; 1(5): 349-358.
22. Baradaran A, Rabiei Z, Rafieian M, Shirzad H. A review study on medicinal plants affecting amnesia through cholinergic system. *Journal of Herb Med Pharmacology* 2012; 1(1): 3-9.
23. Rabiei Z, Rafieian-kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari S. Effects of *Zizyphus jujube* extract on memory and learning impairment induced by bilateral electric lesions of the nucleus basalis of Meynert in rat. *Neurochemical Research* 2014; 39(2): 353-360.
24. Rahimian G-A, Rabiei Z, Tahmasebi B, Rafieian-Kopaei M, Ganji F, Rahimian R. Comparing the Combined Effect of Garlic and Mint Extract with Metronidazole in *Helicobacter Pylori* Treatment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 9(3): 63-70.
25. Mirhoseini M, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants, diabetes mellitus and urgent needs. *J Herb Med Pharmacol* 2013; 2(2): 53-54.
26. Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. *J Med Food* 2011; 14(9): 969-974.
27. Shirzad M, Kordyazdi R, Shahinfard N, Nikokar M. Does Royal jelly affect tumor cells? *J HerbMed Pharmacol* 2013; 2(2): 45-48.
28. Neychev VK, Mitev VI. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. *J Ethnopharmacol* 2005; 101(1-3): 319-323.
29. Angelova S, Gospodinova Z, Krasteva M, Antov G, Lozanov V, Bozhanov S, et al. Antitumor activity of Bulgarian herb *Tribulus terrestris* L. on human breast cancer cells. *J BioSci Biotech* 2013; 2(1): 25-32.
30. Bedir E, Khan IA, Walker LA. Biologically active steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. *Pharmazie* 2002; 57(7): 491-493.
31. Hu K, Yao X. Methyl protogracillin (NSC-698792): the spectrum of cytotoxicity against 60 human cancer cell lines in the National Cancer Institute's anticancer drug screen panel. *Anticancer Drugs* 2001; 12(6): 541-547.